SeroCP™ IgM

Imuno-ensaio Enzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgM específicos de ***Chlamydia pneumoniae*** no soro humano

Manual de Instruções

Kit para 96 determinações
(Número de catálogo. A192-01M)
Kit para 192 determinações
(Número de catálogo. B192-01M)

Para ser utilizado em Diagnóstico ***In Vitro***
Apenas para uso profissional
Conservar a 2-8°C. **Não congelar**

Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL
Tel.: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnostics.com

Uso Indicado
O kit SeroCP IgM é utilizado para a detecção de anticorpos específicos da classe IgM contra Chlamydia pneumoniae no soro humano.

O kit SeroCP IgM é um kit de imunoensaio (ELISA) qualitativo, que é utilizado como um auxiliar no diagnóstico de infecção causada por Chlamydia pneumoniae .

Para Diagnóstico In Vitro .

Introdução

Chlamydia pneumoniae (TWAR) é um agente infeccioso , que apresenta uma variedade de manifestações clínicas incluindo infecções do tracto respiratório superior e inferior (1). A maioria das infecções causadas por C. pneumoniae é leve ou assintomática. No entanto, ele pode causar doenças graves, como a faringite, sinusite, bronquite aguda e pneumonia adquirida na comunidade. Infecções não detectadas ou não tratadas podem causar doenças persistentes e prolongadas. Dados recentes mostram uma possível associação entre infecções causadas por C. pneumoniae e doenças crónicas (2).

A seroprevalência de C. pneumoniae em crianças é baixa, mas aumenta significativamente para a vida adulta, após o que se mantém a um nível elevado (> 50 %). Dificuldades na recolha da amostra e na inacessibilidade das áreas infectadas, afectam sériamente a utilidade dos métodos de detecção direta. Portanto, os testes serológicos são usados rotineiramente e servem como um método não-invasivo para a identificação de Chlamydia tanto passadas como crónicas e (3), onde os métodos de detecção directa raramente são eficazes (4). Além disso, a presença de certos tipos de anticorpos são um indicador do estado de doença. A infecção primária por Chlamydia é caracterizada por uma resposta de IgM predominante nas primeiras 2-4 semanas e uma resposta subsequente de IgG e IgA nas seguintes 6-8 semanas. Após uma infecção aguda a IgM de C.pneumoniae desaparece na maioria dos casos, após 2-6 meses (5) e o título de anticorpo IgG diminui lentamente, as IgA tendem a desaparecer rapidamente (6). Quando se suspeita de infecção primária de Chlamydia, a presença de anticorpos da subclasse IgM tem um alto valor diagnóstico (7). No entanto, infecções recorrentes ou infecções crónicas, o nível de anticorpos IgM é baixo e é por isso que a ausência de IgM não exclui necessariamente uma infecção em curso. Em re-infecção, o título de IgG e IgA aumenta rapidamente, normalmente em 1-2 semanas (8).

Os anticorpos da classe IgA demonstraram ser um marcador imunológico confiável de infecções primárias, crónicas e recorrentes. Em geral, o título de anticorpos diminui rapidamente para níveis de linha de base, uma vez que a infecção por clamídia foi erradicada tratada e (3) a persistência de elevado título de anticorpos IgA é considerado um indicador de infecção crónica (6). Anticorpos das subclasses de IgG persistem por longos períodos e diminuem lentamente. Portanto, a presença de anticorpos IgG, indica principalmente uma infecção por Chlamydia com um tempo indeterminado. No entanto, um aumento de 4 vezes no nível de IgG ou IgG de um valor muito alto pode indicar uma infecção crónica em curso. SeroCP é um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando como antigénio corpos elementares de purificado de C. pnemoniae (TWAR-183) para detectar a resposta imunológica em seres humanos. Para um completo diagnóstico de infecções em curso, crónicas ou passadas, é recomendado determinar a presença de anticorpos IgG, IgA e IgM contra C. pneumoniae.

Principio do Teste

- As placas SeroCP são revestidas com corpos elementares de C. pnemoniae (TWAR 183) purificada como antigénio.
- O soro a testar é diluído e incuba-se nas placas SeroCP durante 1 hora a 37 ° C. Neste passo, os anticorpos contra a C. pneumoniae ligam-se aos antigénios imobilizados .
- Os anticorpos que não reagiram são removidos pela lavagem.
- O anticorpo anti-IgM humano, conjugado com peroxidase de rábano (HRP) foi adicionado e incubado 1h a 37 ° C. Neste passo, o conjugado de peroxidase liga ao complexo antigénio-anticorpo já formado.
- O conjugado não ligado é removido por lavagem.
- Após adição do substrato -TMB, há hidrolise pela peroxidase e redução, uma vez que o substrato torna-se azul.
- Ao adicionar a solução de paragem (solução stop), a cor azul fica amarela e deve ser lida num leitor de placas ELISA no comprimento de onda de 450 nm.
- A absorvância é proporcional à quantidade de anticorpo específico ligado ao antigénio imobilizado.

Procedimento

Adicionar 2x50µl de Controlo Negativo e 1x50µl controlo positivos assim como as amostras diluídas 1/105 para os poços revestidos com antigénio C. pneumoniae
↓
Cobrir a placa e incubar durante 1 h a 37 ° C, com uma humidade de 100%
↓
Lavar 3 vezes com a solução de lavagem (300-350µl Wash Buffer)
↓
Adicionar 50 ul de conjugado com peroxidase (HRP conjugado), diluído 1/300

↓
Cobrir a placa e incubar durante 1 h a 37 ° C, com uma humidade de 100%
↓
Lavar 3 vezes com a solução de lavagem (300-350µl Wash Buffer)
↓
Adicionar 100 µl de substrato TMB (TMB- substrato)
↓
Cobrir a placa e incubar durante 15 min à temperatura ambiente
↓
Adicionar 100 µl de solução de paragem (Stop Solution). Ler a absorvância a 450 nm
↓
Calcular e interpretar os resultados

Conteúdo do Kit

Kit para 96 testes **Referência A192 -01M**

1. **Microplaca revestida com antigénio de C. pneumoniae:**
   96 poços separáveis (8x12), revestidos com o antigénio de C. pneumoniae, embalados numa bolsa de alumínio contendo uma placa de gel de sílica.
   1 Placa
2. **Solução de Lavagem Concentrada (20x)**: Solução de PBS e Tween .
   1 frasco, 100ml
3. **Diluente de Soro-IgM (vermelho):** Anti- IgG humana em tampão , pronto para uso . Contém menos do que 0,05 % de Proclin, como conservante.
   1 frasco, 60ml
4. **Conjugado Diluente (verde):** Uma solução tamponada pronta para uso. Contém menos do que 0,05 % de Proclin, como conservante.
   1 frasco, 40ml
5. **Controlo negativo:** soro humano IgM negativo para C. pneumoniae, solução pronta a usar. Contém menos do que 0,05 % de Proclin e menos de 0,1 % de azida de sódio como conservantes.
   1 frasco, 2,5 ml
6. **Controlo positivo**: soro humano IgM positivo para C. pneumoniae, solução pronta a usar. Contém menos do que 0,05 % de Proclin e menos de 0,1 % de azida de sódio como conservantes.
   1 frasco, 2,0 ml
7. **Conjugado-HRP concentrado (300X):** Anticorpo anti-IgM humano (específico cadeia µ) conjugado com peroxidase de rábano (HRP), que contém menos de 0,05 % de Proclin como conservante.
   1 frasco, 0,2 ml
8. **Substrato TMB** : Solução pronta para usar. Contendo 8. 3,3',5,5' tetrametilbenzidina como cromogénio e peroxidase como substrato.
   1 frasco, 14ml
9. **Solução Stop** (Solução de paragem) :
   Solução pronta para usar. Contendo H2SO4 1M.
   1 frasco, 15ml
10. **Cobertura da placa**: **1 unidade**
11. **Instruções de uso**: **1**

Kit para 192 testes **Referência B192-01M**

1. **Microplaca revestida com antigénio de C. pneumoniae:**
   96 poços separáveis (8x12), revestidos com o antigénio de C. pneumoniae, embalados numa bolsa de alumínio contendo uma placa de gel de sílica.
   2 Placas
2. **Solução de Lavagem Concentrada (20x)**: Solução de PBS e Tween .
   2 frascos, 100ml
3. **Diluente de Soro-IgM (vermelho):** Anti- IgG humana em tampão , pronto para uso . Contém menos do que 0,05 % de Proclin, como conservante.
   2 frascos, 60ml
4. **Conjugado Diluente (verde):** Uma solução tamponada pronta para uso. Contém menos do que 0,05 % de Proclin, como conservante.
   1 frasco, 80ml
5. **Controlo negativo:** soro humano IgM negativo para C. pneumoniae, solução pronta a usar. Contém menos do que 0,05 % de Proclin e menos de 0,1 % de azida de sódio como conservantes.
   1 frasco, 2,4 ml
6. **Controlo positivo**: soro humano IgM positivo para C. pneumoniae, solução pronta a usar. Contém menos do que 0,05 % de Proclin e menos de 0,1 % de azida de sódio como conservantes.
   1 frasco, 1,25 ml
7. **Conjugado-HRP concentrado (300X):** Anticorpo anti-IgM humano (específico cadeia µ) conjugado com peroxidase de rábano (HRP), que contém menos de 0,05 % de Proclin como conservante.
   1 frasco, 0,2 ml
8. **Substrato TMB** : Solução pronta para usar. Contendo 8. 3,3',5,5' tetrametilbenzidina como cromogénio e peroxidase como substrato.
   1 frasco, 24ml
9. **Solução Stop** (Solução de paragem) :
   Solução pronta para usar. Contendo H2SO4 1M.
   1 frasco, 30ml
10. **Cobertura da placa**: **2 unidades**
11. **Instruções de uso**: **1**

Materiais Necessários mas não Fornecidos

1. Tubos de ensaio limpos para a diluição do soro do paciente.
2. Frascos plásticos descartáveis para a diluição do concentrado de conjugado-HRP.
3. Micropipetas ajustáveis, ou multicanal (varia de 5-50 , 50-200 , 200 -1000µl) e pontas descartáveis.
4. Reservatório de precipitados (1 litro).
5. Proveta (50 ml).
6. 6. Frasco plástico (lavagem).
7. Papel absorvente.
8. Vortex.
9. Banho a 37 ° C, com tampa, ou câmara de incubação húmida a 37 °C.
10. Leitor de placas de ELISA com um filtro de 450 nm.
11. Água desionizada ou duplamente destilada.

Precauções

Para utilização em Diagnostico *In Vitro*

1. Este kit contém soro humano foi analisada por técnicas aprovadas pela FDA e CE e descobriram que é negativa para o HBsAg, e anticorpos para o HCV e HIV-1 e 2. No entanto, como não existe um método conhecido que possa oferecer total garantia de que os produtos derivados do sangue humano não transmitem a infecção, todos os componentes do sangue humano previstos nas amostras do kit devem ser tratados como amostras de soro ou sangue potencialmente infecciosos, de acordo com as recomendações publicadas no manual do CDC / NIH " Biossegurança em Laboratórios de Micro Biológicas e Biomédicas " (Biossegurança em laboratórios de microbiologia e Biomédica), 1988 .
2. O material de substrato TMB é irritante para a pele e membranas mucosas. Evite o contacto directo.
3. Todos os componentes do kit são calibrados e testados por lote. Não é recomendado usar soluções de lotes diferentes, uma vez que pode afectar os resultados.
4. O ácido sulfúrico diluído (H_2SO_4 1M) é irritante para a pele e olhos. Em caso de contacto com os olhos, lave imediatamente com água e consulte um médico.

Conservação e estabilidade dos reagentes

1. Todos os materiais fornecidos devem ser armazenados a 2-8 °C. Os reagentes em frascos fechados são estáveis até a data de validade indicada no rótulo. Expondo os componentes do kit de recém-abertos à temperatura ambiente durante algumas horas , não produz quaisquer danos . **NÃO CONGELAR REAGENTES**.
2. O kit expira 90 dias depois de ter sido aberto.
3. Tiras não utilizadas, devem ser conservadas em recipientes fechados na bolsa de folha de embalagem com gel de sílica, envolvendo a bolsa ao longo da abertura e selagem com fita adesiva.
4. É possível que exista formação de cristais na solução de concentrado de lavagem (20x) devido à armazenagem a frio, isto é perfeitamente normal. Os cristais são redissolvido por aquecimento da solução a 37 ° C antes da diluição. Uma vez diluída, a solução pode ser guardada a 2-8 °C até 21 dias.

Colheita de soro

O soro deve ser preparado a partir de amostras colhidas de forma asséptica utilizando técnicas padrão. As amostras que tenham sido inactivadas pelo calor não devem ser utilizadas. Não é recomendado o uso de soro lipémico, turvo ou contaminado. Partículas ou precipitados no soro podem causar resultados errados. Estas amostras devem ser clarificadas por centrifugação ou filtragem antes de submete-las a avaliação.

Conservação das amostras

As amostras podem ser armazenadas entre 2-8 ° C até 7 dias (recomendamos a adição de 0,1% de azida de sódio). Se necessitar armazenamento a longo prazo, as amostras devem ser armazenadas a -20 ° C em alíquotas. Evite repetir o descongelamento e congelamento.

Procedimento de Ensaio - Manual

Protocolo para automatização, disponível sob requisição

A. Preparação dos reagentes

1. Todos os reagentes e amostras devem estar à temperatura ambiente da sala. Homogeneizar as amostras e os controlos positivos e negativos antes da utilização.
2. Determinar o número de amostras testadas. Além das amostras, em cada ensaio deve ser adicionado dois poços com controlo negativo e um com controlo positivo.
3. Remova a microplaca da embalagem de alumínio, cortando perto do lado selado. Remova o número de tiras necessárias (de acordo com o número de amostras de ensaio) e coloque na microplaca.
4. Diluir a solução de lavagem concentrada 1/20 com água bidestilada ou desionizada. Por exemplo, para preparar um litro de solução de lavagem, adicionar 50 ml de solução de lavagem concentrada para 950 ml de água destilada ou duplamente desionizada. ado a 950ml de água destilada ou bi-desionizada.

B. A incubação das amostras e controlos

5. Dilui-se cada amostra de soro do paciente 1/105 com diluente de soro fornecido, da seguinte maneira: Adicionam-se 5 µl de soro de um paciente para 520µl de diluente de soro.
   Diluição em duas etapas: Diluir cada amostra de soro do paciente 1/105 com diluente de soro fornecido, como se segue : adicionar 10 µl de soro de um paciente a 200 ul diluente Soro (1/ 21) e, em seguida, diluiu-se pela adição de 25 ul da diluição 1/21 a 100µl diluente soro .
   Nota: O diluente do soro contém anticorpos anti-IgG humano para a remoção de anticorpos IgG a partir de soro humano.
6. Adicionar 50 ul a cada poço de controlo positivo , de controlo negativo e do soro diluído a 1/ 105. O Controlo negativo deve ser adicionado em dois poços separados.
7. Cobrir as tiras com uma tampa de placa e incubar durante 1 hora a 37 ° C numa câmara húmida.
8. Descartar o líquido dos poços.
9. Lavar: Encher completamente cada poço com solução de lavagem e descarte o líquido, repita este passo mais duas vezes, para um total de três vezes.
10. Seque o suporte e tiras tocando em papel de filtro.

C. A incubação com conjugado

11. O conjugado-HRP concentrado deve ser diluído imediatamente antes da utilização.
    Diluir o concentra do conjugado anti-IgM humana-HRP 1/300 com diluente do conjugado. Por exemplo, para preparar duas tiras, prepare um mínimo de 3ml conjugado -HRP diluído (10 ul de conjugado-HRP concentrado, misturado com 3 ml de Diluente do Conjugado) .
12. Adicionar 50 ul de conjugado diluído a cada poço.
13. Cobrir as tiras com uma tampa de placa e incubar durante 1 hora a 37 ° C numa câmara húmida.
14. Descartar o líquido e lavar os poços como descrito nas etapas 9 e 10.

D. Incubação com TMB- substrato

15. Adicione 100µl Substrato-TMB em cada poço, cubra com tampa de placa e incube à temperatura ambiente durante 15 minutos.
16. Parar a reacção pela adição de solução de paragem a cada poço 100µl (H_2SO_4 1M).

E. Determinação dos Resultados

17. Determinar a absorvância a 450 nm, e anotar os resultados. A leitura não deve ser feita após 30 minutos de paragem da reacção cromogênica.
Nota: *Todas as bolhas de ar têm de ser removidas antes da leitura. A base da placa ELISA deve ser limpa cuidadosamente.*

Validação do Ensaio

Para que o teste seja válido, deve seguir os seguintes critérios . Se estes critérios não forem satisfeitos, o teste deve ser considerado inválido e deve ser repetido.

1. **Controlo Positivo**: A absorção deve ser ≥ 0,8 a 450 nm.

2. **Controlo Negativo** : A absorvância média do controle negativo (NC) deve ser de 0,1 <CN ≤ 0,4 a 450 nm.

O cálculo do valor de corte (VPC) e o índice de ponto de corte (IPC)

O valor de corte foi calculado de acordo com a fórmula seguinte : **VPC=CN*2**

CN = Absorção média a 450nm dos Controlos Negativos testados em duplicado. Para normalizar os resultados obtidos nos diferentes ensaios, o índice de corte é calculado de acordo com a seguinte fórmula :

$$IPC = \frac{\text{Absorvância a 450nm do soro testado}}{VPC}$$

Interpretação dos Resultados

Tabela 1: Correlação entre a absorvância a 450 nm e a presença de anticorpos IgM frente a C. pneumoniae

Absorvância (450nm)	IPC	Resultado	Interpretação do diagnóstico
O.D <1.4xVPC	<1.4	**Negativo** Anticorpos IgM não detectados	**Não há indicação de infecção actual por causa de *C.pneumoniae***
1.4xVPC≤O.D ≤ 1.5xVPC	1.4-1.5	**Limite** Nivel baixo de anticorpos IgM	**Indicativo de uma possível exposição a *C. pneumoniae*** Uma segunda amostra deverá ser submetida a avaliação após 2-4 semanas1
O.D>1.5xVPC	>1.5	**Positivo** Níveis relevantes de anticorpos IgM	**Indicativo de infecção em curso por *C. pneumoniae***

1. Em caso de resultados duvidosos, uma segunda amostra deve ser colhida após 2-4 semanas e testada em conjunto com a primeira amostra. Se voltar a obter um nível limite, a amostra deve ser considerada negativa.

   Para obter um perfil mais completo de anticorpos, IgA e IgG, devem ser testados .

Tabela 2: Interpretação dos resultados combinados dos níveis de anticorpos IgG, IgA e IgM a C. Pneumoniae. Interpretação dos resultados

			Interpretação dos resultados
IgM	**IgG**	**IgA**	
Negativo	Negativo	Negativo	No há indicação de infecção de *C.pneumoniae*
Positivo	Negativo ou Positivo	Negativo ou Positivo	Indicativo de infecção em curso
Negativo	Positivo	Negativo	Indicativo de infecção em curso ou passada
Negativo	Negativo ou Positivo	Positivo	Indicativo de infecção em curso ou crónica

Limitações do Procedimento

1. Não use apenas um único teste sorológico para o diagnóstico final. Devem ser levados em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.
2. As amostras recolhidas no início de uma infecção primária, não contêm quantidades detectáveis de anticorpos. Se suspeitar de uma infecção por Chlamydia, uma segunda amostra deve ser obtida decorridas 2-4 semanas, e testada em paralelo com a amostra original.

.

Características do ensaio

Tabela 3: Teste de comparação do ensaio SeroCP IgM com um ensaio microimunofluorescência (MIF) da mesma origem O kit SeroCP™ IgM foi avaliado em comparação com Chlamydia IgM SeroFIA™ (Savyon Diagnostics Ltd. Cat. No. 512-01).
O estudo foi efectuado em dois centros médicos, usando 113 amostras de soro de indivíduos sintomáticos (33) e crianças sãs (80).

SeroFia™ / SeroCP™	Positivo	Negativo	Total
Positivos	30	4	34
Negativos	3	76	79
Total	33	80	113

Sensibilidade: 30/33 x 100 = 91%
Especificidade: 76/80 x 100 = 95%
Concordância entre ambos os métodos:
106/113 x 100 = 94%

Precisão

Num mesmo Ensaio

Amostras	No. de Réplicas	Média	CV%
Positivas	10	1.469	2.3
Negativas	10	0.236	4.7

Entre **Ensaios**

Amostras	No. de Réplicas	Média	CV%
Positivas	10	0.605	5.4
Negativas	10	0.163	6.0

Bibliografia

1. Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) Clin Microbiol REV; 8:451-461.
2. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Ann. Intern. Med. 116: 273-278.
3. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984). *Chlamydia pnemonitis* and its serodiagnosis in infants. J. Infect. Dis. 149: 598-604.
4. Campbell, L.A. (1993). PCR detection of *Chlamydia pneumoniae* In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252
5. Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A. (1994). Post-therapeutic evolution of serum *chlamydia* antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertility and Sterility. 62: No. 3.
6. Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinon, M., Eckman, M.R., Makela, P.H. and Valtonen, V. (1988). Serological Evidence of an Association of a Novel *Chlamydia* TWAR with Chronic Coronary Heart Disease and Acute Myocardial Infarction. Lancet. 2: 983-986.
7. Grayston, J.T., Cambell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P. (1989). A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J. Inf. Dis. 161: 618-625.
8. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Mannin, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.

Representante Europeu Autorizado : Obelis S.A.
Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels
Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
E-mail: mail@obelis.net Tlm: +32.475.45.46.60